

28. Raha S. Robinson B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, and ageing // TIBS. - 2000. - Vol.25. - P.502-508.
29. Rahman I., MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases // Thorax. - 1998. - Vol.53. - P.601-612.
30. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. D.-Y. Jin, H.Z. Chae, S.G. Rhee, K.-T. Jeang // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol.272, N 49. - P.30952-30961.
31. Schmitz M.L., Baeuerle P.A. Multi-step activation on NF-kB/Rel transcription factors // Immunobiol. - 1995. - Vol.193, N 2-4. - P.116-127.
32. Schroder E., Ponting C.P. Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily // Prot. Sci. - 1998. - Vol.7. - P.2465-2468.

Поступила 28.01.2001г.

Принята в печать 01.03.2001г.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ ПОСЛЕ СТРЕССА И КРОВОПОТЕРИ

БЕЛЯЕВА Л.Е., ШЕБЕКО В.И., СОЛОДКОВ А.П.

*Витебский государственный медицинский университет,
Кафедра патофизиологии*

Резюме. Цель работы – изучить влияние N-ацетилцистеина (N-АЦ) и предварительно перенесенного стресса на динамику изменения тонуса коронарных сосудов изолированного сердца в ответ на увеличение действия напряжения сдвига после острой кровопотери. Опыты выполнены на 64 крысах-самках линии Wistar, распределенных по группам: (1) контроль, (2) 6-часовой иммобилизационный стресс (ИС), (3) 2-часовая постгеморрагическая артериальная гипотензия (САД 40-50 мм рт. ст), (4) «стресс+кровопотеря».

Острая кровопотеря приводила к уменьшению величины максимального коронарного перфузионного давления (КПД) на 33,1%, по сравнению с контролем в ответ на резкое увеличение объемной скорости перфузии с 4 до 20 мл/мин. Во всех опытных группах отмечалось увеличение выраженности эндотелийзависимого снижения тонуса коронарных сосудов на 1-й минуте после действия возрастающего напряжения сдвига. N-АЦ, так же, как и предварительно перенесенный стресс, предупреждал снижение максимального значения КПД после кровопотери. Кроме того, N-АЦ существенно уменьшал выраженность эндотелийзависимого снижения тонуса коронарных сосудов в ответ на увеличение действующего напряжения сдвига после стресса, кровопотери и их сочетанного влияния, а также полностью блокировал реакцию увеличения содержания нитратов/нитритов в сыворотке крови всех опытных животных.

Введение N-АЦ и предварительно перенесенный стресс сходным образом изменяют функциональное состояние клеток коронарных сосудов. Одним из главных механизмов такого влияния может быть изменение редокс-состояния клеток сосудистой стенки.

Ключевые слова: кровопотеря, стресс, N-ацетилцистеин, коронарные сосуды, редокс-состояние.

Abstract. The aim of the present work was to study the influence of N-acetylcysteine (NAC) and preexistent immobilization stress on the changes of coronary perfusion pressure (CPP) in response to the increase of the shear stress after acute hemorrhage. The experiments were carried out in 64 female Wistar rats divided to the following groups: (1) control; (2) 6-h immobilization stress; (3) 2-h posthemorrhagic arterial hypotension (MAP 40-50 mm Hg); (4) «stress+hemorrhage».

Acute hemorrhage resulted in the decrease of maximal CPP by 33,1% compared with the control after dramatic elevation of the volume velocity of coronary flow (from 4 to 20 ml/min). The degree of shear stress induced endothelium-

dependent coronary vasodilatation was more noticeable in all experimental groups than in the control one. NAC, as well as immobilization stress preconditioning, prevented the decrease of the maximal CPP following posthemorrhagic hypotension. Moreover, NAC led to significant reduction of endothelium-dependent shear stress induced coronary vasodilatation in all experimental groups and completely blocked the reaction of the increasing $\text{NO}_3/\text{NO}_2^-$ after stress, hemorrhage and in the group «stress+hemorrhage».

N-acetylcysteine administration and preliminary 6-h immobilization stress similarly result in the changes of the functional state of the coronary vessel cells. One of the main mechanisms of this action may be the alteration of the redox-state of the coronary vessel cells.

Ранее было установлено, что предварительно перенесенный 6-часовой иммобилизационный стресс (ИС) предупреждал нарушение способности коронарных сосудов к ауторегуляции, наблюдающееся после острой кровопотери [2]. Механизмы такого действия стресса на функцию коронарных сосудов неизвестны. Можно предполагать, что влияние стресса на функцию коронарных сосудов реализуется через изменение редокс-состояния клеток сосудистой стенки, прежде всего эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток сосудов. Такое предположение основано на хорошо известных данных об увеличении образования свободных радикалов кислорода при стрессе [5].

В последние годы установлено также, что N-ацетилцистеин (N-АЦ), низкомолекулярный тиолсодержащий антиоксидант, способен эффективно блокировать действие редокс-зависимых внутриклеточных сигнальных механизмов [9, 10]. Цель работы – изучить влияние N-АЦ, а также предварительно перенесенного стресса на динамику изменения тонуса коронарных сосудов при увеличении действия напряжения сдвига после кровопотери.

Методы исследования

Опыты выполнены на 64 крысах-самках линии Wistar, распределенных по группам: (1) контроль; (2) 6-часовой иммобилизационный стресс; (3) 2-часовая постгеморрагическая артериальная гипотензия; (4) постгеморрагическая гипотензия на фоне предварительно вызванного ИС. ИС моделировали путем жесткой фиксации крыс в

положении на спине. Постгеморрагическую гипотензию вызывали с помощью многократных кровопусканий из сонной артерии под контролем среднего артериального давления, поддерживая его на уровне 40 – 50 мм рт. ст. в течение 2 часов. Проведено три серии экспериментов. В первой серии опытов изолированное сердце крысы перфузировали в условиях постоянного потока. Исходная объемная скорость коронарного потока (ОСКП) составляла 4 мл/мин. После стабилизации исходного коронарного перфузионного давления ($\text{КПД}_{\text{исх}}$) ОСКП резко увеличивали до 20 мл/мин. Такое повышение ОСКП приводило к увеличению напряжения сдвига, действующего на эндотелиоциты коронарных сосудов. После резкого увеличения ОСКП КПД вначале возрастало и достигало максимального значения (КПД_{max}), а спустя 45-90 секунд оно снижалось ($\text{КПД}_{45-90''}$). Выраженность эндотелий-зависимого снижения тонуса коронарных сосудов в ответ на увеличение напряжения сдвига оценивали по величине степени ускользания КПД (СУ). СУ – это выраженная в процентном отношении степень снижения КПД на 45-90-й сек., рассчитанная на 1 мм рт.ст. первоначального увеличения КПД при повышении ОСКП с 4 до 20 мл/мин.

$$\text{СУ} = \frac{\Delta \text{КПД}_2 \cdot 100\%}{\Delta \text{КПД}_1^2}$$

где $\Delta \text{КПД}_1$ – разность между величинами максимального и исходного КПД,

$\Delta \text{КПД}_2$ – разность между величиной КПД_{max} и наименьшим значением КПД, установившимся спустя 45-90 сек. после пика его повышения.

Во второй серии экспериментов определяли содержание восстановленной формы глутатиона [8] и малонового диаль-

дегида (МДА) в ткани сердца [1], а также концентрацию нитратов/нитритов в сыворотке крови с помощью реактива Грисса. Конверсию нитратов в нитриты проводили цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди [4].

В третьей серии экспериментов изучали влияние N-АЦ (40 мг/кг, внутрибрюшинно). N-АЦ вводили: а) контрольным животным – за 1 час до выделения сердца, б) в группах «стресс» и «стресс+кровопотеря» – за 1 час до начала фиксации животных, в) в группе «кровопотеря» – через 1 час после начала кровопускания. Оценивали динамику изменения КПД при увеличении объемной скорости перфузии изолированного сердца.

Полученный цифровой материал обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты

Исходные величины КПД при ОСКП, равной 4 мл/мин были практически одинаковыми в контрольной и опытных группах крыс (таблица 1). Максимальное значение КПД после ИС и в группе «стресс+кровопотеря» не отличалось от такового в контроле. После кровопотери обнаруживалось уменьшение значения КПД_{max} на 33,1%, по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Выраженность снижения КПД после его первоначального резкого увеличения была существенно больше во всех опытных группах. Величины КПД_{45-90"} после стресса, кровопотери и их сочетанного влияния снижались на 19,4-35,5%, по сравнению с контрольной. При этом значения СУ во всех опытных группах превышали таковую в контроле в 2,7-3,7 раза. Следовательно, после стресса, кровопотери и в группе «стресс+кровопотеря» увеличивалась выраженность эндотелийзависимого снижения тонуса коронарных сосудов в ответ на увеличение действующего на эндотелиоциты этих сосудов напряжения сдвига.

Введение N-АЦ контрольным животным не приводило к достоверным изменениям величин исходного и максимального

КПД после резкого увеличения ОСКП. N-АЦ также не влиял на значения КПД_{45-90"} и СУ в контроле. В то же время, в группе «кровопотеря+N-АЦ» величина КПД_{max} существенно возрастала и составляла $120,1 \pm 18,0$ мм рт. ст., против $85,7 \pm 5,2$ мм рт. ст. после кровопотери без использования N-АЦ ($p < 0,05$). N-АЦ также способствовал достоверному увеличению значения КПД_{45-90"} после кровопотери и незначительному повышению этой величины в группах «стресс» и «стресс+кровопотеря». Величина СУ при использовании N-АЦ в опытных группах достоверно уменьшалась, по сравнению с таковой в этих же группах без применения N-АЦ. Значит, N-АЦ уменьшал выраженность эндотелийзависимого снижения тонуса коронарных сосудов при резком увеличении напряжения сдвига после стресса, кровопотери и в группе «стресс+кровопотеря».

Содержание нитратов/нитритов в сыворотке крови крыс увеличивалось после перенесенного стресса, кровопотери и их сочетанного влияния на 101,97 и 47%, соответственно, по сравнению с контролем (таблица 2). Перенесенный стресс ограничивал увеличение концентрации нитратов/нитритов в сыворотке крови в условиях кровопотери. Предварительное введение опытным животным N-АЦ не влияло на содержание нитратов/нитритов в сыворотке крови контрольных животных, однако полностью предупреждало увеличение содержания нитратов/нитритов после стресса, кровопотери и в группе «стресс+кровопотеря». Концентрация МДА в ткани сердца увеличивалась после стресса, кровопотери и их сочетанного влияния на 76,7, 97,9 и 145,7%, соответственно, по сравнению с контролем. ИС, кроме того, приводил к уменьшению содержания восстановленной формы глутатиона в миокарде на 40,6%, по сравнению с таковым в контроле.

Обсуждение

Большая выраженность эндотелийзависимого снижения тонуса коронарных сосудов при увеличении действия напряжения сдвига во всех опытных группах свидетель-

Таблица 1

Влияние N-ацетилцистеина на динамику изменения величин коронарного перфузионного давления (КПД) при резком увеличении объемной скорости перфузии изолированного сердца с 4 мл/мин до 20 мл/мин

Группы	Коронарное перфузионное давление, мм рт.ст.			
	Исходное	Максимальное	Через 45-90 сек. после достижения максимального значения	СУ, % × мм рт.ст. ⁻¹
Контроль (n=12)	31,6±2,1	128,0±19,0	105,2±15,0	0,20±0,02
Контроль+N-АЦ (n=7)	37,3±4,8	116,0±13,9	100,9±9,1	0,25±0,07
Стресс (n=8)	34,6±4,7	117,3±23,0	84,8±12,3*	0,54±0,08*
Стресс+N-АЦ (n=7)	26,7±5,5	115,0±25,6	93,7±21,8	0,29±0,07**
Кровопотеря (n=11)	32,2±3,5	85,7±5,2*	67,8±5,2*	0,73±0,10*
Кровопотеря+N-АЦ (n=11)	39,1±5,6	120,1±18,4**	88,3±10,2*, **	0,38±0,06*, **
Стресс+кровопотеря (n=8)	27,5±3,7	112,7±14,8	70,4±5,8*	0,62±0,11*
Стресс+кровопотеря+N-АЦ (n=8)	32,3±6,9	112,6±24,1	94,6±23,4	0,42±0,07*, **

Примечание: * -p<0,05 сравнение величин с группой «контроль», ** -p<0,05 сравнение величин с аналогичной группой без применения N-АЦ

Таблица 2

Содержание нитратов/нитритов в сыворотке крови крыс, а также концентрация малонового диальдегида и восстановленного глутатиона в миокарде контрольных и опытных животных

Группы	Содержание нитратов/нитритов, мкМоль/л		МДА, мкМоль/мл	Восстановленный глутатион, мкМоль/л
	без применения N-ацетилцистеина	в условиях применения N-ацетилцистеина		
Контроль (n=10)	33,8±3,8	34,0±4,2	4,33±0,20	68,5±6,3
Стресс (n=10)	68,0±2,7*	19,8±3,3	7,65±1,30*	40,7±4,5*
Кровопотеря (n=10)	66,8±12,2*	33,2±4,5	8,57±1,37*	65,2±6,1
Стресс+кровопотеря (n=10)	49,8±2,2*	33,4±3,9	10,64±1,60*	58,7±6,4

Примечание: * -p<0,05 сравнение величин с группой «контроль»

ствует о возможности увеличения агонист-индуцируемого образования оксида азота в эндотелиоцитах этих сосудов после стресса, кровопотери и их сочетанного влияния. Сходные данные были получены при изучении влияния ИС на характер эндотелийзависимого «потокиндуцированного» снижения тонуса сосудов почки [6]. В качестве косвенного доказательства повышения ба-

зальной продукции NO в эндотелии вполне можно рассматривать результаты опытов, показывающие увеличение концентрации нитратов/нитритов в сыворотке крови крыс в опытных группах.

N-АЦ практически полностью устранял увеличение выраженности эндотелийзависимого «потокиндуцированного» снижения тонуса коронарных сосудов, наблю-

дающееся после ИС и существенно уменьшал таковое после кровопотери. Этот эффект N-АЦ, вероятно, мог быть связан с его действием на редокс-зависимые механизмы внутриклеточной сигнализации. Так, N-АЦ мог изменять взаимодействие между эндотелиоцитарной NO-синтазой (eNOS) и компонентами кавеол, а также степень фосфорилирования eNOS [7]. Последний из предполагаемых механизмов особенно интересен. Известно, что активность eNOS при действии напряжения сдвига на эндотелиоциты существенно зависит как от фосфорилирования самого фермента, так и протеинов, взаимодействующих с эндотелиоцитарной NO-синтазой. Степень же фосфорилирования eNOS определяется балансом между активностью тирозиновых фосфатаз и тирозиновых протеинкиназ. Увеличение образования активных форм кислорода (АФК) способно подавлять функцию тирозиновых киназ через окисление одного из цистеиновых остатков в молекуле этих ферментов [9]. Результатом такого действия АФК может быть преобладание активности тирозиновых протеинкиназ и увеличение степени базального фосфорилирования компонентов эндотелиоцитарной NO-синтазы. Такое рассмотрение событий могло бы отчасти объяснить как факт повышения базальной активности конституциональной NO-синтазы в эндотелиоцитах, так и увеличение эндотелийзависимой вазодилатации после стресса и кровопотери. Поэтому вполне вероятно, что N-АЦ, вмешиваясь в механизмы редокс-зависимой регуляции процесса фосфорилирования eNOS, мог эффективно видоизменять активность этого фермента после стресса и кровопотери.

Снижение величины KPD_{max} после острой кровопотери, вероятно, связано как с существенным увеличением базальной активности eNOS, так и с вероятным нарушением сократительной функции гладкомышечных клеток коронарных сосудов. О возможности такого нарушения после кровопотери свидетельствует меньшее повышение тонуса коронарных сосудов в ответ на введение ингибитора NO-синтазы, по

сравнению с таковым после стресса, а также сочетанного воздействия стресса и кровопотери [3]. Уменьшение степени снижения величины KPD_{max} после кровопотери на фоне предварительно перенесенного стресса, возможно, связано с изменением редокс-состояния клеток коронарных сосудов и миокарда. В пользу такого предположения свидетельствует накопление МДА, отражающее увеличение образования активных форм кислорода после стресса и снижение содержания в миокарде восстановленной формы глутатиона.

Подчеркнем, что как введение N-АЦ через 1 час после начала кровопускания, так и предварительно перенесенный стресс препятствовали уменьшению сократительного ответа гладкомышечных клеток коронарных сосудов при увеличении ОСКП. Объяснить такое действие N-АЦ достаточно трудно. Нам представляется, что защитный эффект N-АЦ прежде всего связан с предупреждением нарушения редокс-состояния эндотелиальных и гладкомышечных клеток коронарных сосудов в условиях кровопотери. В частности, N-АЦ мог препятствовать истощению внутриклеточных запасов кальция в эндоплазматическом ретикулуме и нарушению его мобилизации из этого депо.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. N-ацетилцистеин и предварительно перенесенный 6-часовой иммобилизационный стресс оказывают сходное влияние на характер изменения механизмов регуляции тонуса коронарных сосудов после острой кровопотери.

2. N-ацетилцистеин не только предупреждает снижение сократительного ответа гладкомышечных клеток коронарных сосудов после кровопотери, но и уменьшает выраженность эндотелийзависимого «потокиндуцированного» снижения тонуса коронарных сосудов после стресса, кровопотери и в группе «стресс+кровопотеря».

3. Влияние N-ацетилцистеина и предварительно перенесенного 6-часового иммобилизационного стресса, вероятно, опосредуется через редокс-зависимые

механизмы изменения функциональных свойств эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

Литература

1. Андреева Л. И., Кожемякин А. А., Кишкун А. А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. // Лаб. дело, 1988, N 11, с. 41-43.
2. Беляева Л. Е., Цвирко И. А. К механизму нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда после сочетанного воздействия стресса и кровопотери. // Теоретические и практические вопросы медицины и фармации. - Витебск: ВГМУ, 2000. - С. 36-39.
3. Беляева Л.Е., Шебеко В.И., Солодков А.П. Сходство влияния N-ацетилцистеина и предварительно перенесенного стресса на характер нарушения тонуса коронарных сосудов после острой кровопотери. // Труды Республиканской научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования». Витебск, 2000, с. 52-59.
4. Веремей И.С., Солодков А.П. и соавт. Восстановление NO_3^- в NO_2^- цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди. // Сб. научн. трудов ВГМУ, посвященный 40-летию фарм. факультета. Витебск, 1999. - С. 274-277.
5. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессовых и ишемических повреждений сердца. Москва, «Медицина», 1984, 269 с.
6. Солодков А.П. Влияние стресса на индуцированное перфузионным потоком изменение тонуса сосудов почки. // Проблемы теоретической медицины и фармации: Сб. Научн. трудов Витебск, 1997. -С. 46-49.
7. Шебеко В. И. Редокс-регуляция динамического характера фенотипа эндотелиоцитов кровеносных сосудов. // Труды Республиканской научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования». Витебск, 2000. С. 45-52.
8. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. // Arch. Biochem. Biophys. 1959, Vol. 82, P. 70.
9. Herrlich P., Bohmer F.D. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. // Biochem. Pharmacol.-2000-Vol.59, N 1.-P. 35-41.
10. Kamata U., Hirata H. Redox regulation of cellular function. // Cell Signal.-1999-Vol.11, N 1.-P. 1-14.

Поступила 28.01.2001г.

Принята в печать 01.03.2001г.

Медицинская литература Витебского государственного медицинского университета

Генералов И.И. Абзимная активность иммуноглобулинов. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2000. - 151 с.

Радецкая Л.Е., Супрун Л.Я. Эндометриозная болезнь (патогенез, диагностика, лечение). - Витебск: изд-во ВГМУ, 2000. - 111 с.

Бекиш О.-Я.Л. Медицинская биология. Учебное пособие. - Мн.: Ураджай, 2000. - 520с.

Бекиш О.-Я.Л., Храмцова Л.А. Практикум по медицинской биологии. Учебное пособие. - Мозырь: ИД «Белый ветер», 2000 - 224с.

Мяделец О.Д. Гистология, цитология и эмбриология человека. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2000. - 188 с.

Шеин И.А. Рентгенологическое исследование мочевой системы урологических больных в норме и патологии. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2000. - 138 с.